

УДК 616.36; 615.47

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИТОЗОЛЯ ПЕЧЕНИ СВИНЕЙ В КАЧЕСТВЕ БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ДЕТОКСИКАЦИИ ПРИ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Рябинин В.Е., Полевщикова Е.Е., Пушкарев С.А., Попков П.Н., Куренков Е.Л., Стасюк А.А., Дубасов А.Ю., Гробовой С.И., Мухаметжанова Р.И.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: cct49@mail.ru

Изучена возможность использования цитозоля печени свиней в качестве биоматериала для экстракорпоральной детоксикации при печеночной недостаточности. Показано, что в цитозоле содержатся достаточно высокие концентрации глюкозы и АТФ, способные обеспечивать течение различных метаболических процессов, имеется оптимальное соотношение пирувата и лактата, определяющее направленность окислительных процессов, и высокая биосинтетическая активность, проявляющаяся в способности к синтезу мочевины и элиминации аммиака. Это свидетельствует о достаточной эффективности и безопасности использования цитозоля печени в целях экстракорпоральной детоксикации и нормализации обменных процессов при лечении различного рода интоксикаций и заболеваний печени, сопровождающихся печеночной недостаточностью. При этом разработка соответствующего лиофилизированного продукта позволит увеличить его клиническую доступность.

Ключевые слова: цитозоль печени, экстракорпоральная детоксикация, окислительные и биосинтетические процессы

APPLICATION OF CYTOSOL FROM PORCINE LIVER AS A BIOMATERIAL FOR EXTRACORPOREAL DETOXIFICATION IN THE CASE OF LIVER FAILURE

Ryabinin V.E., Polevshikova E.E., Pushkarev S.A., Popkov P.N., Kurenkov E.L., Stasyuk A.A., Dubasov A.Y., Grobovoi S.I., Muchametzhanova R.I.

South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: cct49@mail.ru

The application of cytosol from porcine liver as a biomaterial for extracorporeal detoxification in the case of liver failure has been studied. It has been shown that cytosol contains enough high concentrations of glucose and ATP that are capable to provide course of different metabolic processes. There is the optimal correlation of pyruvat's and lactat's concentrations determining direction of oxidative processes and high biosynthetic activity of liver's cytosol appearing in the opportunity to the urea synthesis and ammonia elimination. It testifies to sufficient efficacy and safety of use of liver's cytosol for extracorporeal detoxification and normalization metabolic processes in the case of treatment of different kinds of intoxication and liver diseases accompanied by liver failure. At the same time development of the appropriate lyophilized product will allow to enhance its clinical availability.

Keywords: cytosol of liver, extracorporeal detoxification, oxidative and biosynthetic processes

Лечение печеночной недостаточности остается в настоящее время по-прежнему актуальной проблемой, так как несмотря на разработку новых лекарственных препаратов и биомедицинских технологий заболеваемость и смертность при этом состоянии продолжает оставаться на чрезвычайно высоком уровне [4]. Недостаточная эффективность существующих экстракорпоральных методов лечения (гемодиализ, гемосорбция, плазмаферез и др.) связана с тем, что эти методы детоксикации моделируют лишь экскреторную (элиминирующую) функцию печени, не затрагивая при этом обменные процессы. Для повышения терапевтической эффективности были предложены различные системы детоксикации типа «Биоискусственная печень» с перфузией крови через специальные катриджи с клетками печени свиней и человека [6,7], практическое использование которых затруднено в силу технологических и экономических проблем, связанных с выделением, хранением

и поддержкой функциональной активности изолированных гепатоцитов. Новым подходом при создании устройств типа «Биоискусственная печень» явилась разработка системы экстракорпоральной детоксикации и нормализации обменных процессов с помощью цитозоля печени, содержащего митохондриальную и микросомальную фракции [5].

Целью данного исследования явилось изучение возможности использования лиофилизированного цитозоля печени свиней в качестве биоматериала для систем экстракорпоральной детоксикации.

Материалы и методы исследования

Цитозоль печени (ЦП) получали по ранее описанному методу [5]. Гомогенат печени подвергали дифференциальному центрифугированию при 4000 g в течение 10 минут, что позволяло отделить цитозоль от неразрушенных клеток печени, клеточных мембран и ядер. Получаемый таким образом ЦП содержит 23 ± 1% митохондриальной фракции, 8 ± 1% – микросомальной и 69 ± 1% – растворимой фракции

от общего количества белка цитозоля. В ряде экспериментов использовался как свежеприготовленный ЦП, так и подвергнутый сублимационному лиофильному высушиванию на установке LZ-9 (Германия).

Определение содержания среднемолекулярных пептидов (СМП) проводили с реактивом Бенедикта, а «средних молекул» (СМ) – по Габриэлян Н.И. [2]. Содержание мочевины определяли по унифицированному методу с диацетилмонооксидом [3], аммиака – по методу Белкина А.Л. и Осадчей Л.П. [1], глюкозы – с использованием готовых наборов реактивов фирмы KONE (Финляндия), АТФ – с использованием наборов фирмы Boehringer Mannheim (Австрия), молочной кислоты – с помощью наборов УП «ЗЕРО-МЕД» (Россия), а пировиноградной кислоты – с использованием наборов реактивов «PYRUVAT-TEST» фирмы Fermognost (Германия). Полученные данные подвергали обработке с помощью методов вариационной статистики. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Как известно, тяжёлые патологические состояния печени характеризуются выраженными нарушениями функционирования многих систем гепатоцитов и в первую очередь систем трансформации и аккумуляции энергии, биотрансформации и детоксикации эндогенных веществ и ксенобиотиков, нарушениями многих окислительных процессов, что часто приводит к гибели самих клеток печени, накоплению в организме большого числа токсичных продуктов, веществ средней молекулярной массы, ряда

недоокисленных соединений и др. Это является в свою очередь причиной неадекватного функционирования печени и формирования печеночной недостаточности с проявлениями гипераммониемии, ацидоза, гипогликемии, нарушений электролитного состава крови и другими нарушениями обмена веществ. В связи с этим представляло интерес исследовать возможность использования ЦП в качестве биоматериала, способного осуществлять процессы биотрансформации и детоксикации, энергообмена, окислительно-восстановительные реакции и другие виды метаболических превращений при экстракорпоральном взаимодействии с кровью. Оценку биологической активности ЦП проводили при температуре 37°C и активной оксигенации, осуществляемой барбатированием воздуха через специальную систему вибрационного компрессора.

Результаты экспериментов показали, что при инкубации ЦП свиней, получаемого растворением в бидистиллированной воде предварительно лиофилизированного цитозоля, содержащего митохондриальную и микросомальную фракции, и при инкубации аналогичного, не подвергавшегося лиофилизации свежеприготовленного ЦП крыс, на всём протяжении эксперимента в течение 2-х часов содержание АТФ в данных биологических системах находится на достаточно высоком стабильном уровне (табл. 1).

Таблица 1

Содержание АТФ в образцах цитозолей печени свиньи и крысы, предварительно лиофилизированных и не подвергавшихся лиофилизации

Время инкубации (мин)	C^x (mkM) АТФ	C^{xx} (mkM) АТФ
0	1300 ± 200	1700 ± 300
30	1360 ± 200	1530 ± 90
60	1280 ± 40	1550 ± 90
90	1390 ± 20	1600 ± 200
120	1360 ± 60	1570 ± 50

Примечания: C^x – концентрация АТФ в нелиофилизированном цитозоле печени крыс; C^{xx} – концентрация АТФ в предварительно лиофилизированном цитозоле печени свиньи.

Полученные данные свидетельствуют о высокой энергетической обеспеченности ЦП и возможности протекания в данном биоматериале многих энергозависимых метаболических процессов. Кроме того, эти данные позволяют сделать вывод о том, что процедура лиофилизации получаемого по нашей методике ЦП свиньи, содержащего митохондриальную и микросомальную фракции, не приводит при последующем растворении лиофилизата к утрате его способности поддерживать высокие уровни макроэргов, в частности АТФ.

Исследование уровня кислотности среды в процессе инкубации ЦП показало, что в течение нескольких часов наблюдается определенное увеличение рН с дальнейшей стабилизацией (табл. 2). Такое увеличению рН, по нашему мнению, в клинических условиях может дать дополнительный потенциал коррекции уровня кислотности крови пациентов в состоянии ацидоза и повышения общей буферной ёмкости крови в кислотной области. Кроме того, тенденция к увеличению уровня рН при инкубации цитозоля благоприятна в отношении состо-

яния самого цитозоля, так как в известной степени ограничивает активность кислых лизосомальных гидролаз.

Изучение содержания глюкозы показало определенное увеличение ее концентрации на всём протяжении инкубации исследуемых составов (табл. 2, 3), что может быть связано с распадом гликогена. Зна-

чительно более низкое исходное значение концентрации глюкозы и менее значительный наблюдаемый прирост в ЦП крысы по сравнению с ЦП свиньи, на наш взгляд, связаны с более низким содержанием гликогена в ткани печени крыс, которые в течение суток перед забором органа выдерживались без пищи.

Таблица 2

Содержание глюкозы, пировиноградной и молочной кислот, значения pH в нелиофилизированном цитозоле печени крысы

Время инкубации (ч)	Глюкоза С (мМ)	Пируват С (мМ)	Лактат С (мМ)	$C_{\text{пирув}}/C_{\text{лакт}}$	pH
0	6,8 ± 0,0	32,0 ± 2,8	760 ± 340	0,04 ± 0,01	7,10 ± 0,10
1	7,1 ± 0,6	47,1 ± 3,1	800 ± 234	0,06 ± 0,01	7,24 ± 0,10
2	7,7 ± 0,2	64,4 ± 3,7	820 ± 301	0,08 ± 0,02	7,45 ± 0,10
4	10,0 ± 0,5	35,2 ± 2,1	840 ± 311	0,04 ± 0,01	7,58 ± 0,10
6	10,3 ± 0,5	92,4 ± 5,6	860 ± 239	0,11 ± 0,03	7,53 ± 0,11

Таблица 3

Содержание глюкозы, пировиноградной и молочной кислот в лиофилизированном цитозоле печени свиньи

Время инкубации (ч)	Глюкоза С (мМ)	Пируват С (мМ)	Лактат С (мМ)	$C_{\text{пирув}}/C_{\text{лакт}}$
0	22,0 ± 1,2	14 ± 4	1110 ± 60	0,013 ± 0,020
1	22,9 ± 0,5	57 ± 7	1100 ± 60	0,052 ± 0,025
3	24,9 ± 0,5	80 ± 2	1170 ± 20	0,068 ± 0,023
4	27,7 ± 0,6	108 ± 14	1150 ± 20	0,094 ± 0,031

Анализ концентраций молочной кислоты показал, что при инкубации ЦП крысы наблюдается незначительный прирост лактата на 13 %, в то время как в растворе ЦП свиньи его содержание остается стабильным (табл. 2, 3). Концентрация пировиноградной кислоты при этом в обоих видах цитозолей постоянно нарастает, и её прирост к концу эксперимента в ЦП крысы составляет около 100 %, а в ЦП свиньи – около 570 %. Хотя представленные данные не позволяют безоговорочно судить об источниках образования пирувата в цитозоле печени (процесс гликолиза, окисление глицерина, переаминирование аланина и др.), но тем не менее дают основание сделать вывод о достаточно высокой интенсивности протекания окислительных процессов в исследуемых биоматериалах, поддерживающих на необходимом уровне содержание NAD^+ и позволяющих сдвигать равновесие лактатдегидрогеназной реакции в сторону образования пировиноградной кислоты. Этот факт, с нашей точки зрения, является благоприятным в плане использования цитозоля печени в системах экстракорпоральной детоксикации, так как превращение лактата в пируват под воздействием

данного состава может способствовать частичному устранению накопления первого при нарушениях окислительных процессов в организме. Образовавшийся пируват может в этом случае включаться с участием цитозоля в другие метаболические процессы посредством декарбоксилирования и образования аланина.

Исследования содержания свободного аммиака в свежеприготовленном цитозоле печени крысы показали (табл. 4), что при инкубации ЦП крысы в течение первого часа наблюдается увеличение концентрации аммиака. Такой прирост наблюдается и в эксперименте, где сразу же после отбора пробы в нулевой точке инкубации цитозоля вводили дополнительное количество аммиака в виде изотонического раствора NH_4Cl (добавочная концентрация 600 мкМ).

Эксперименты по исследованию содержания аммиака в предварительно лиофилизированном ЦП свиньи дали аналогичные результаты и могут свидетельствовать об определенном увеличении концентрации аммиак-лабильных соединений (карбамилфосфат и цитруллин) в начальный период инкубации с последующей стабилизацией их концентрации.

Таблица 4

Содержание аммиака в образцах цитозолей печени свиньи и крысы

Время инкубации (мин)	$\text{NH}_3\text{C}^x(\text{mkM})$	$\text{NH}_3\text{C}^{\text{xx}}(\text{mkM})$	$\text{NH}_3\text{C}^{\text{xxx}}(\text{mkM})$
0	370 ± 30	330 ± 100	240 ± 20
30	570 ± 10	1200 ± 100	401 ± 15
60	608 ± 5	1270 ± 30	490 ± 20
120	560 ± 180	1420 ± 50	500 ± 50
240	640 ± 20	1350 ± 40	480 ± 10

Примечания: C^x – нелиофилизированный цитозоль печени крысы; C^{xx} – нелиофилизированный цитозоль печени крысы с добавкой аммиака 600 мкМ; C^{xxx} – предварительно лиофилизированный цитозоль печени свиньи.

Исследования содержания мочевины при инкубации образцов ЦП свиней и крыс показали (табл. 5), что данные биологические системы обладают способностью синтезировать мочевины. Кроме того, введение в цитозоль дополнительного количества аммиака в виде соли аммония (NH_4Cl) приводит к усилению процесса образования мочевины. Так, по данным, приведённым в табл. 5, концентрация мочевины в ЦП

свиньи, предварительно подвергнутом лиофилизации в течение первого получаса инкубации, остаётся практически на одном уровне, а по истечении этого времени начинает возрастать. Эти данные свидетельствуют об отсутствии в цитозоле в начальный период инкубации достаточных количеств непосредственных предшественников мочевины (аргинина и аргининянтарной кислоты).

Таблица 5

Содержание мочевины в образцах цитозолей печени свиньи и крысы

Время инкубации (мин)	$\text{C}^x(\text{mM})$	$\text{C}^{\text{xx}}(\text{mM})$	$\text{C}^{\text{xxx}}(\text{mM})$
0	$1,17 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,02$
30	$1,19 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,02$
60	$1,20 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,03$
120	$1,22 \pm 0,06$	$0,52 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,04$
240	$1,32 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,02$

Примечания: C^x – нелиофилизированный цитозоль печени крысы; C^{xx} – нелиофилизированный цитозоль печени крысы с добавкой аммиака 600 мкМ; C^{xxx} – предварительно лиофилизированный цитозоль печени свиньи.

Аналогичные результаты были получены при использовании свежеприготовленного ЦП крысы (табл. 5). При исследовании стимуляции синтеза мочевины после введения хлорида аммония был выявлен более значительный прирост концентрации мочевины в начальный период инкубации. Таким образом, представленные экспериментальные данные свидетельствуют о способности ЦП осуществлять процессы синтеза мочевины при соответствующей элиминации аммиака и таким образом осуществлять важную детоксикационную функцию.

Изучение содержания средних молекул (СМ) и среднемолекулярных пептидов (СМП) показало, что в процессе инкубации наблюдается уменьшение содержания СМ и СМП в свежеприготовленном ЦП крысы (табл. 6, 7). В то же время в ЦП

свиньи в течение пяти часов наблюдается незначительный рост СМ и отсутствие достоверных изменений в содержании СМП.

Характер изменения концентрации СМ и СМП при инкубации исследуемых видов цитозолей печени позволяет констатировать отсутствие активации процессов протеолиза на всём протяжении эксперимента. Очевидно, имеющее место незначительное увеличение содержания СМ при инкубации ЦП свиньи не следует считать следствием активации протеолитических ферментов цитозоля или усиления гидролиза рибонуклеиновых кислот, так как в начальный период инкубации наблюдается значительный более интенсивный рост концентрации СМ, а затем этот процесс замедляется. Наиболее вероятно, при этом имеет место лишь сдвиг в динамике образования и гидролиза белков и РНК.

Таблица 6

Содержание «средних молекул» в образцах цитозолей печени свиньи и крыс

Время инкубации (ч)	СМ ^x (D ₂₅₄)	СМ ^{xx} (D ₂₅₄)	СМ ^x (D ₂₆₀)	СМ ^{xx} (D ₂₆₀)
0	0,89 ± 0,20	0,83 ± 0,03	0,70 ± 0,16	0,64 ± 0,04
1	0,85 ± 0,30	0,90 ± 0,02	0,070 ± 0,13	0,71 ± 0,02
2	0,83 ± 0,37	0,91 ± 0,02	0,71 ± 0,21	0,73 ± 0,02
3	0,79 ± 0,14	0,93 ± 0,01	0,68 ± 0,02	0,77 ± 0,02
4	0,68 ± 0,10	0,94 ± 0,03	0,55 ± 0,08	0,78 ± 0,02
5	0,64 ± 0,02	0,94 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,78 ± 0,02

Примечания: С^x – нелиофилизированный цитозоль печени крысы; С^{xx} – предварительно лиофилизированный цитозоль печени свиньи.

Таблица 7

Содержание среднемолекулярных пептидов в образцах цитозолей печени свиньи и крыс

Время инкубации (ч)	СМП ^x (ед/мл)	СМП ^{xx} (ед/мл)
0	0,80 ± 0,28	0,88 ± 0,13
1	0,56 ± 0,24	0,83 ± 0,03
2	0,41 ± 0,05	0,86 ± 0,02
3	0,41 ± 0,04	0,90 ± 0,08
4	0,40 ± 0,04	0,89 ± 0,20
5	0,41 ± 0,05	0,89 ± 0,13

Примечания: С^x – нелиофилизированный цитозоль печени крысы; С^{xx} – предварительно лиофилизированный цитозоль печени свиньи.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показали наличие высокой биологической активности и безопасности цитозоля печени, содержащего митохондриальную и микросомальную фракции, что позволяет рассчитывать на его эффективное применение в качестве экстракорпорального материала при коррекции интоксикаций и метаболических нарушений. При этом разработка соответствующего лиофилизированного продукта позволит увеличить его клиническую доступность без снижения биологической активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке по гранту ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение № 8275).

Список литературы

1. Белкин А.Л., Осадчая Л.П. Определение концентрации аммиака в небольших количествах крови // Лаб. дело. – 1977. – № 3. – С. 177.
2. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // Лаб. дело. – 1984. – № 3. – С. 138–140.
3. Гуторанов В. Модифицированный диметилглиоксимный метод определения содержания мочевины в биологических жидкостях // Лаб. дело. – 1982. – № 10. – С. 29–30.
4. Пасечник И.Н., Кутепов Д.Е. Печеночная недостаточность: современные методы лечения. – М.: МИА, 2009. – 240 с.
5. Рябинин В.Е., Гробоной С.И., Ткачев С.И., Кравчук И.Е. Исследование свойств цитозоля печени и эффективности способа его использования в аппарате «биологическая вспомогательная печень» // Вестник АМН. – 2002. – № 3. – С. 21–24.
6. Giri S., Braumann U.D., Giri P., Acikgoz A., Scheibe P., Nieber K., Bader A. Nanostructured self-assembling peptides as a defined extracellular matrix for long-term functional maintenance of primary hepatocytes in a bioartificial liver modular device // Intern. J. Nanomedicine. – 2013. – Vol. 8. – P. 1525–1539.
7. Erro E., Bundy J., Massie I., Chalmers S-A., Gautier A., Gerontas S., Hoare M., Sharratt P., Choudhury S., Lubowiecki M., Llewellyn I., Legallais C., Fuller B., Hodgson H., Selden C. Bioengineering the Liver: Scale-Up and Cool Chain Delivery of the Liver Cell Biomass for Clinical Targeting in a Bioartificial Liver Support System // BioResearch Open Access. 2013. Vol.2 no. 1. pp. 1–11.

lyn I., Legallais C., Fuller B., Hodgson H., Selden C. Bioengineering the Liver: Scale-Up and Cool Chain Delivery of the Liver Cell Biomass for Clinical Targeting in a Bioartificial Liver Support System // BioResearch Open Access. – 2013. – Vol. 2. – № 1. – P. 1–11.

References

1. Belkin A.L., Osadchaja L.P. Opredelenie koncentracii ammiaka v nebol'shix kolichestvah krovi // Lab. delo. 1977. no. 3. pp. 177.
2. Gabrijeljan N.I., Lipatova V.I. Opyt ispol'zovanija pokazatelya srednih molekul v krovi dlja diagnostiki nefrologicheskix zabolevanij u detej // Lab. delo. 1984. no. 3. pp. 138–140.
3. Gutoranov V. Modificirovannyj dimetilglioksimnyj metod opredelenija soderzhanija mocheviny v biologicheskix zhidkostjakh // Lab. delo. 1982. no. 10. pp. 29–30.
4. Pasechnik I.N., Kutepov D.E. Pechenochnaja nedostatochnost': sovremennye metody lechenija. M.: MIA, 2009. 240 p.
5. Rjabinin V.E., Grobovoj S.I., Tkachev S.I., Kravchuk I.E. Issledovanie svojstv citozolja pečeni i jeffektivnosti sposoba ego ispol'zovanija v apparate «biologicheskaja vspomogatel' naja pečen» // Vestnik AMN. 2002. no. 3. pp. 21–24.
6. Giri S., Braumann U.D., Giri P., Acikgoz A., Scheibe P., Nieber K., Bader A. Nanostructured self-assembling peptides as a defined extracellular matrix for long-term functional maintenance of primary hepatocytes in a bioartificial liver modular device // Intern. J. Nanomedicine. 2013. Vol. 8 pp. 1525–1539.
7. Erro E., Bundy J., Massie I., Chalmers S-A., Gautier A., Gerontas S., Hoare M., Sharratt P., Choudhury S., Lubowiecki M., Llewellyn I., Legallais C., Fuller B., Hodgson H., Selden C. Bioengineering the Liver: Scale-Up and Cool Chain Delivery of the Liver Cell Biomass for Clinical Targeting in a Bioartificial Liver Support System // BioResearch Open Access. 2013. Vol.2 no. 1. pp. 1–11.

Рецензенты:

Цейликман В.Э., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии, ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск;
 Тишевская Н.В., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 01.08.2013.